

用matK序列分析探讨木兰属植物的系统发育关系

^{1,2}王亚玲 ²李勇 ²张寿洲* ²余兴生

¹(西北农林科技大学生命科学学院 陕西杨凌 712100)

²(深圳仙湖植物园 深圳 518004)

The utility of matK gene in the phylogenetic analysis of the genus *Magnolia*

^{1,2}WANG Ya-Ling ²LI Yong ²ZHANG Shou-Zhou* ²YU Xing-Sheng

¹(School of Life Sciences, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China)

²(Shenzhen Fairy Lake Botanical Garden, Shenzhen 518004, China)

Abstract A phylogenetic analysis of the Magnoliaceae was performed based on sequence data of the chloroplast matK gene in 57 species representing 11 genera. The results show that (1) the genus *Magnolia* might be a polyphyletic group; (2) *Magnolia* subgenus *Yulania* should be elevated to the generic rank; (3) the section *Splendentes* in *Magnolia* subgenus *Magnolia* had a very close relationship with the two American species in the section *Rytidospermum*, *M. macrophylla* and *M. dealbata*, and the section *Gwillimia* was close to the section *Theorhodon*; (4) the generic status of the genus *Talauma* was highly supported when its Asian section *Blumiana* was shifted to *Magnolia*; and (5) the genus *Parakmeria* formed a clade with the two genera *Kmeria* and *Manglietiastrum*; and they all had a close relationship with *Magnolia* subgenus *Yulania* and the genus *Michelia*. The position of flower buds, a major feature which had been previously employed to differentiate *Micheliae* and *Magnolieae*, turned out to be an unreliable character obscuring the distinction between the two tribes. The traditional circumscription of these two tribes should be emended. *Magnolia* and *Michelia* would become two well-defined genera when the subgenus *Yulania* was segregated from *Magnolia* to be treated as an independent genus.

Key words Magnoliaceae, *Magnolia*, matK gene, phylogenetic analysis.

摘要 用木兰科Magnoliaceae 57种植物的matK基因序列构建了该科的系统发育分支图。结果表明: (1)木兰属*Magnolia* L.是一个因为性状的趋同演化而建立的多系类群; (2)木兰亚属*Magnolia*和玉兰亚属*Yulania*亲缘关系较远, 支持将后者从该属中分出建立玉兰属*Yulania* Spach, 木兰亚属作为木兰属保留; (3)木兰亚属的sect. *Splendentes* Dandy ex Vazquez组与皱种组sect. *Rytidospermum* Spach的两个美洲种*M. macrophylla* Michaux和*M. dealbata* Zucc.亲缘关系较近, 荷花玉兰组sect. *Theorhodon* Spach与常绿组sect. *Gwillimia* DC.的亲缘关系较近, (4)盖裂木属*Talauma* Juss.可以成立, 而其分布于亚洲的*Blumiana* Blume组可归入木兰属; (5)拟单性木兰属*Parakmeria* Hu & Cheng、华盖木属*Manglietiastrum* Law以及单性木兰属*Kmeria* (Pierre) Dandy形成一个单系群, 与玉兰亚属和含笑属*Michelia* L.的亲缘关系较近。花的着生位置不足以作为木兰科的分族依据, 含笑族*Micheliae*和木兰族*Magnolieae*的特征及其界定应做修改。将玉兰亚属从木兰属分出后, 木兰属与含笑属无性状交叉, 成为两个区别明显的属。

关键词 木兰科; 木兰属; matK 基因; 系统发育分析

2004-02-04 收稿, 2005-06-06 收修改稿。

* 通讯作者(Author for correspondence. E-mail: szzhang@yahoo.com.cn)。

木兰属 *Magnolia* L. 为木兰科 Magnoliaceae 种类最多的属, 约有 75 种, 占全科总数的 1/3, 同时也是该科中分布最广的类群, 分布于亚洲、美洲的亚热带和温带, 在热带地区也有少量分布(刘玉壶, 1984)。木兰属在性状上与木兰科其他属有很多交叉, 如木兰属木兰亚属 subgen. *Magnolia* Dandy 的雌蕊群柄组 sect. *Gynopodium* Dandy 与拟单性木兰属 *Parakmeria* Hu & Cheng 在雌蕊群具柄、具雄株和两性株的性状上有交叉(胡先骕, 郑万钧, 1951); 荷花玉兰组 sect. *Theorhodon* Spach 和木莲属 *Manglietia* Bl. 具有结构相近的花和果实(刘玉壶, 1984); 木兰属玉兰亚属 subgen. *Yulania* (Spach) Reichenb. 和含笑属 *Michelia* L. 都有腋生花(Figlar, 2000)。因此, 木兰属植物的主要特征(顶生花、每心皮 2 胚珠)存在一定程度的变异, 以致与其他属界限不清。这是木兰科分类的焦点问题之一。

木兰科的分类系统主要有 3 个, 即 Dandy(1964) 系统、刘玉壶(1984) 系统、Nooteboom (1985, 2000) 系统。在 Dandy 系统中, 木兰属包含拟单性木兰属。Nooteboom 1985 年的系统里, 木兰属包含长蕊木兰属 *Alcimandra* Dandy、香木兰属 *Aromadendron* Blume、南美盖裂木属 *Dugendiodendron* G. Lozano、华盖木属 *Manglietiastrum* Law、拟单性木兰属、盖裂木属 *Talauma* Juss.; 其 2000 年的系统里, 木兰属包括了除厚壁木属 *Pachylarnax* Dandy 和鹅掌楸属 *Liriodendron* L. 外的所有属, 并最终将木兰科中除鹅掌楸属外的其他属都归入木兰属(Figlar & Nooteboom, 2004)。本文采用刘玉壶系统(1984), 该系统中木兰属包括木兰亚属和玉兰亚属, 其中木兰亚属下分 8 个组, 玉兰亚属下分 2 个组。

利用一个合适的分子标记进行系统学研究, 能较客观地解决植物类群中的网状进化事件。*matK* 基因约 1500 个碱基对, 位于叶绿体赖氨酸 tRNA 基因(*trnK*)的内含子内, 为单拷贝编码基因(Hilu & Liang, 1997), 是现知被子植物中进化速率较快的基因, 多用于科下属间系统发育关系的研究, 已在木兰科生物地理学(Azuma et al., 2001)、含笑属系统发育(金虹等, 1999)、木兰科系统发育(Azuma et al., 1999, 2000; Shi et al., 2000; Ueda et al., 2000)等方面的研究中得到应用。由于研究目的以及所选用的物种不同, 目前只有有限的种类用于木兰科分子系统学研究中。本研究利用 GenBank 中已注册的 43 个木兰科 *matK* 序列以及本次测定的 14 个种类的 *matK* 序列构建木兰科植物系统发育树, 旨在用尽可能多的种类对木兰属的系统发育关系进行研究, 并对基于 *matK* 序列所推测的种间亲缘关系与传统分类所推测的种间亲缘关系的一致性进行探讨。

1 材料和方法

1.1 材料

材料主要采自深圳市仙湖植物园和中国科学院华南植物园木兰园, 凭证标本存放在仙湖植物园标本馆(SZG)。其余 43 个木兰科植物的 *matK* 序列均取自 GenBank(NCBI)。共有 57 个样本参与到系统分析中: 木兰属 31 种、木莲属 6 种、含笑属 4 种、盖裂木属 6 种、华盖木属 1 种、拟单性木兰属 3 种、单性木兰属 *Kmeria* (Pierre) Dandy 1 种、长蕊木兰属 1 种、合果木属 *Paramichelia* Hu 1 种、观光木属 *Tsoongiodendron* Chun 1 种和鹅掌楸属 2 种(表 1)。

1.2 DNA 提取

选用新鲜幼嫩的叶片作为材料, 采用改进的 CTAB 法(Doyle & Doyle, 1987) 提取总 DNA。

表1 材料来源及GenBank序列号^{*}Table 1 Source of materials and GenBank accession numbers^{*}

分类群 Taxon	来源 Source	凭证标本 Voucher	序列号GenBank Accession No.	地理分布 ¹⁾ Distribution ¹⁾
木兰亚科subfamily Magnolioideae				
木兰族tribe Magnolieae				
木莲亚族subtribe Manglietinae				
木莲属 <i>Manglietia</i> Bl.				
红花木莲 <i>M. insignis</i> (Wall.) Bl.	from GenBank		GBAN-AB055543	Asia
落叶木莲 <i>M. decidua</i> Q. Y. Zheng	from GenBank		GBAN-AB055542	Asia
球果木莲 <i>M. conifera</i> Dandy	from GenBank		GBAN-AB055541	Asia
海南木莲 <i>M. hainanensis</i> Dandy	from GenBank		GBAN-AF123478	Asia
毛桃木莲 <i>M. moto</i> Dandy	from GenBank		GBAN-AF123477	Asia
华盖木属 <i>Manglietiastrum</i> Law				
华盖木 <i>M. sinicum</i> Law	from GenBank		GBAN-AF123479	Asia
木兰亚族subtribe Magnoliinae				
木兰属 <i>Magnolia</i> L.				
木兰亚属subgen. <i>Magnolia</i> Dandy				
常绿组sect. <i>Gwillimia</i> DC.				
夜香木兰 <i>M. coco</i> (Lour.) DC.	from GenBank		GBAN-AB021004	Southeastern China
绢毛木兰 <i>M. albosericea</i> Chun & C. Tsoong	from GenBank		GBAN-AF123464	Southeastern China
大叶玉兰 <i>M. henryi</i> Dunn	from GenBank		GBAN-AF209199	Southeastern China
山玉兰 <i>M. delavayi</i> Franch.	from GenBank		GBAN-AB021005	Southeastern China
红花山玉兰 <i>M. delavayi</i> Franch. (red flowered)	Fairylake Botanical Garden	王亚玲 (Y. L. Wang) 004	GBAN-AF548651	Southeastern China
香港木兰 <i>M. championii</i> Benth.	South China Botanical Garden	王亚玲 (Y. L. Wang) 010	GBAN-AF548648	Southeastern China
勐仑木兰 <i>M. menglunica</i> Q. W. Zeng & Law	South China Botanical Garden	王亚玲 (Y. L. Wang) 024	GBAN-AF548639	Southeastern China
长叶木兰 <i>M. paenetalauma</i> Dandy	South China Botanical Garden	王亚玲 (Y. L. Wang) 013	GBAN-AF548644	Southeastern China
香木兰 <i>M. guangnanensis</i> Law & S. C. Yang	South China Botanical Garden	王亚玲 (Y. L. Wang) 034	GBAN-AF548645	Southeastern China
上思木兰 <i>M. shangsiensis</i> Law, R. Z. Zhou & H. F. Chen	South China Botanical Garden	王亚玲 (Y. L. Wang) 015	GBAN-AF548647	Southeastern China
显脉木兰 <i>M. phanerophlebia</i> B. L. Chen	South China Botanical Garden	王亚玲 (Y. L. Wang) 016	GBAN-AF548652	Southeastern China
馨香玉兰 <i>M. odoratissima</i> Law & R. Z. Zhou	South China Botanical Garden	王亚玲 (Y. L. Wang) 005	GBAN-AF548646	Southeastern China
翅喙组sect. <i>Lirianthe</i> (Spach) Dandy				
<i>M. pterocarpa</i> Roxb.	from GenBank		GBAN-AB055528	Asia
皱纹组sect. <i>Rytidospermum</i> Spach				
<i>M. dealbata</i> Zucc.	from GenBank		GBAN-AB055525	America
日本厚朴 <i>M. hypoleuca</i> Sieb. & Zucc.	South China Botanical Garden	王亚玲 (Y. L. Wang) 018	GBAN-AF548650	Asia
凹叶厚朴 <i>M. officinalis</i> Rehd. & Wils. ssp. <i>biloba</i> (Rehd. & Wils) Law	South China Botanical Garden	王亚玲 (Y. L. Wang) 019	GBAN-AF548643	Asia
三瓣木兰 <i>M. tripetala</i> L.	South China Botanical Garden	王亚玲 (Y. L. Wang) 025	GBAN-AF548649	America
<i>M. macrophylla</i> Michaux	South China Botanical Garden	王亚玲 (Y. L. Wang) 012	GBAN-AF548638	America
天女木兰组sect. <i>Oyama</i> Nakai				
天女木兰 <i>M. sieboldii</i> K. Koch	from GenBank		GBAN-AB055526	Eastern Asia
西康玉兰 <i>M. wilsonii</i> (Finet & Gagnep.) Rehd.	from GenBank		GBAN-AB055527	Eastern Asia

表1(续) Table 1 (continued)

分类群 Taxon	来源 Source	凭证标本 Voucher	序列号GenBank Accession No.	地理分布 ¹⁾ Distribution ¹⁾
Sect. <i>Splendentes</i> Dandy ex Vazquez				
<i>M. splendens</i> Urb.	from GenBank		GBAN-AB055524	Caribbean
<i>M. portoricensis</i> Bello.	from GenBank		GBAN-AB055523	Caribbean
荷花玉兰组sect. <i>Theorhodon</i> Spach				
<i>M. pacifica</i> Vazquez	from GenBank		GBAN-AB055521	America
<i>M. ilitisiana</i> Vazquez	from GenBank		GBAN-AB055520	America
<i>M. yoroconte</i> Dandy	from GenBank		GBAN-AB055522	America
<i>M. schiedeana</i> Schlecht.	from GenBank		GBAN-AB055550	America
荷花玉兰 <i>M. grandiflora</i> L.	Fairylake Botanical Garden	王亚玲 (Y. L. Wang) 007	GBAN-AF548640	America
Sect. <i>Maingola</i> Dandy				
<i>M. carsonii</i> Dandy ex Noot.	from GenBank		GBAN-AB055529	Tropical Asia
玉兰亚属subgen. <i>Yulania</i> (Spach) Reichenb.				
玉兰组sect. <i>Yulania</i> (Spach) Dandy				
玉兰 <i>M. denudata</i> Desr.	from GenBank		GBAN-AF123465	Eastern Asia
凹叶木兰 <i>M. sargentiana</i> Rehd. & Wils	from GenBank		GBAN-AB055532	Eastern Asia
滇藏木兰 <i>M. campbellii</i> Hook. f. & Thoms.	from GenBank		GBAN-AB055531	Eastern Asia
望春玉兰组sect. <i>Buergeria</i> (Sieb. & Zucc.) Dandy				
<i>M. pseudokobus</i> S. Abe & A Kasawa	from GenBank		GBAN-AB040152	Eastern Asia
盖裂木属 <i>Talauma</i> Juss.				
<i>T. mexicana</i> DC.	from GenBank		GBAN-AB055536	America
<i>T. ovata</i> (A.St.Hil.) Spreng.	from GenBank		GBAN-AB055537	America
<i>T. dodecapetala</i> (Lam.) Govaerts	from GenBank		GBAN-AB055534	America
<i>T. caricifragrans</i> (Lozano) Govaerts	from GenBank		GBAN-AB055533	America
<i>T. minor</i> (Urb.) Govaerts	from GenBank		GBAN-AY055535	America
盖裂木 <i>T. Hodgsonii</i> Hook. f. & Thoms.	Fairylake Botanical Garden	王亚玲 (Y. L. Wang) 009	GBAN-AF548642	Southeastern China
拟单性木兰属 <i>Parakmeria</i> Hu & Cheng				
峨嵋拟单性木兰 <i>P. omeiensis</i> Cheng	from GenBank		GBAN-AF123476	Asia
云南拟单性木兰 <i>P. yunnanensis</i> Hu	from GenBank		GBAN-AF123474	Asia
乐东拟单性木兰 <i>P. lotungensis</i> (Chun & C. Tsoong) Law	from GenBank		GBAN-AF123475	Asia
单性木兰属 <i>Kmeria</i> (Pierre) Dandy				
单性木兰 <i>K. septentrionalis</i> Dandy	from GenBank		GBAN-AF107930	Asia
长蕊木兰属 <i>Alcimandra</i> Dandy				
长蕊木兰 <i>A. cathcartii</i> (Hook. f. & Thoms.) Dandy	from GenBank		GBAN-AF123473	Asia
含笑族tribe <i>Micheliaeae</i>				
含笑亚族subtribe <i>Micheliinae</i>				
含笑属 <i>Michelia</i> L.				
醉香含笑 <i>M. macclurei</i> Dandy	from GenBank		GBAN-AB055546	Asia
金叶含笑 <i>M. foveolata</i> Merr. ex Dandy	from GenBank		GBAN-AF123468	Asia
含笑花 <i>M. figo</i> (Lour.) Spreng.	from GenBank		GBAN-AF123467	Asia
白兰 <i>M. alba</i> DC.	from GenBank		GBAN-AF123466	Asia
合果木属 <i>Paramichelia</i> Hu				
合果木 <i>P. baillonii</i> (Pierre) Hu	from GenBank		GBAN-AF123469	Asia
观光木属 <i>Tsoongiodendron</i> Chun				
观光木 <i>T. odorum</i> Chun	from GenBank		GBAN-AF123470	Asia
鹅掌楸亚科Subfamily <i>Liriodendroideae</i>				
鹅掌楸属 <i>Liriodendron</i> L.				
北美鹅掌楸 <i>L. tulipifera</i> L.	from GenBank		GBAN-AY123480	America
鹅掌楸 <i>L. chinense</i> (Hemsl.) Sargent	from GenBank		GBAN-AF123481	Asia

*根据刘玉壶(1984)系统。地理分布依据Nooteboom (2000)。

* The classification system follows Law (1984). The information of geographical distribution is from Nooteboom (2000).

1.3 *matK*区的扩增及纯化

根据GenBank内已注册的木兰科植物 *trnK* 基因序列, 将 *matK* 序列分为3段, 应用OLIGOS软件(Kalendar, 2002)设计引物(表2); 应用正向、反向的引物扩增出 *matK* 片段。扩增反应在Eppendorf梯度PCR扩增仪上进行, 反应体系为25 μL, 包括DNA 20–40 ng, 引物10 pmol, dNTP 0.1 mmol/L, *Taq* DNA聚合酶1 U。扩增程序为: 94℃, 3 min→94℃, 30 s→56℃, 40 s→72℃, 110 s→36个循环→72℃, 7 min。扩增产物用浓度为1.5%的琼脂糖凝胶, 在1×TAB缓冲液中以3.7 V/cm的电压电泳2.5 h后, 割下具 *matK* 片段的胶块, 用 Sangon公司的SK131型UNIQ-10柱式DNA胶回收试剂盒进行DNA的回收和纯化。

表2 木兰科 *matK* 扩增及测序引物

Table 2 Primers used for PCR and sequencing in the Magnoliaceae

引物 Primer	序列 Sequence
<i>matK</i> 正向	5'-ACCCCTGTTCTGACCGTATCGC
<i>matK</i> 反向	5'-TCCATTACATGATCCCATGACC
<i>matK</i> 测序	5'-TGAATCCGTATTAGTGTTCTCCG

1.4 *matK*区DNA测序

测序反应依据双脱氧链终止法(Sanger et al., 1977)原理, 在上述PCR仪上进行, 反应体系10 μL, 包括BigDye Mix 2 μL, 引物5 pmol, 模板20–40 ng, 测序反应程序为98℃, 2 min→94℃, 30 s→56℃, 30 s→60℃, 4 min→25个循环。反应产物经预冷的无水乙醇沉淀, 70%乙醇清洗一次后吹干, 加甲酰胺10 μL, 94℃变性5 min后, 置于冰水混合物中备用, 在ABI3100型自动测序仪上进行序列测定, 并对测定结果进行手工校对。

1.5 数据分析

将从GenBank中得到的43个木兰科植物 *matK* 序列和本次测定的14个序列用BioEdit软件(Hall, 1999)进行格式转换和排序后, 再用PAUP 4.0b10软件(Swofford, 1998)进行统计分析和分支分析。现有的形态学(刘玉壶, 1984)、分子系统学证据(Kim et al., 2001)均表明, 鹅掌楸属为与木兰科其他属可以明显区分的类群, 所以本研究选用鹅掌楸亚科subfamily Liriodendroideae的鹅掌楸和北美鹅掌楸为外类群构建系统树。空位(gap)处理作缺失(missing)状态。最简约树(MP)采用Heuristic法寻找。用bootstrap值检验简约树中各分支的置信度, 自展数据集为1000次。

2 结果

57个木兰科植物的 *matK* 序列排列后的总长度为1459 bp, 用PAUP 4.0b10进行运算。有136个变异位点, 其中67个为信息位点。用Heuristic法找到176棵最简约树, 用严格一致性树(strict consensus tree)进行系统分析(图1)。步长为176, 一致性指数(CI)和保持指数(RI)分别为0.8068和0.9058。

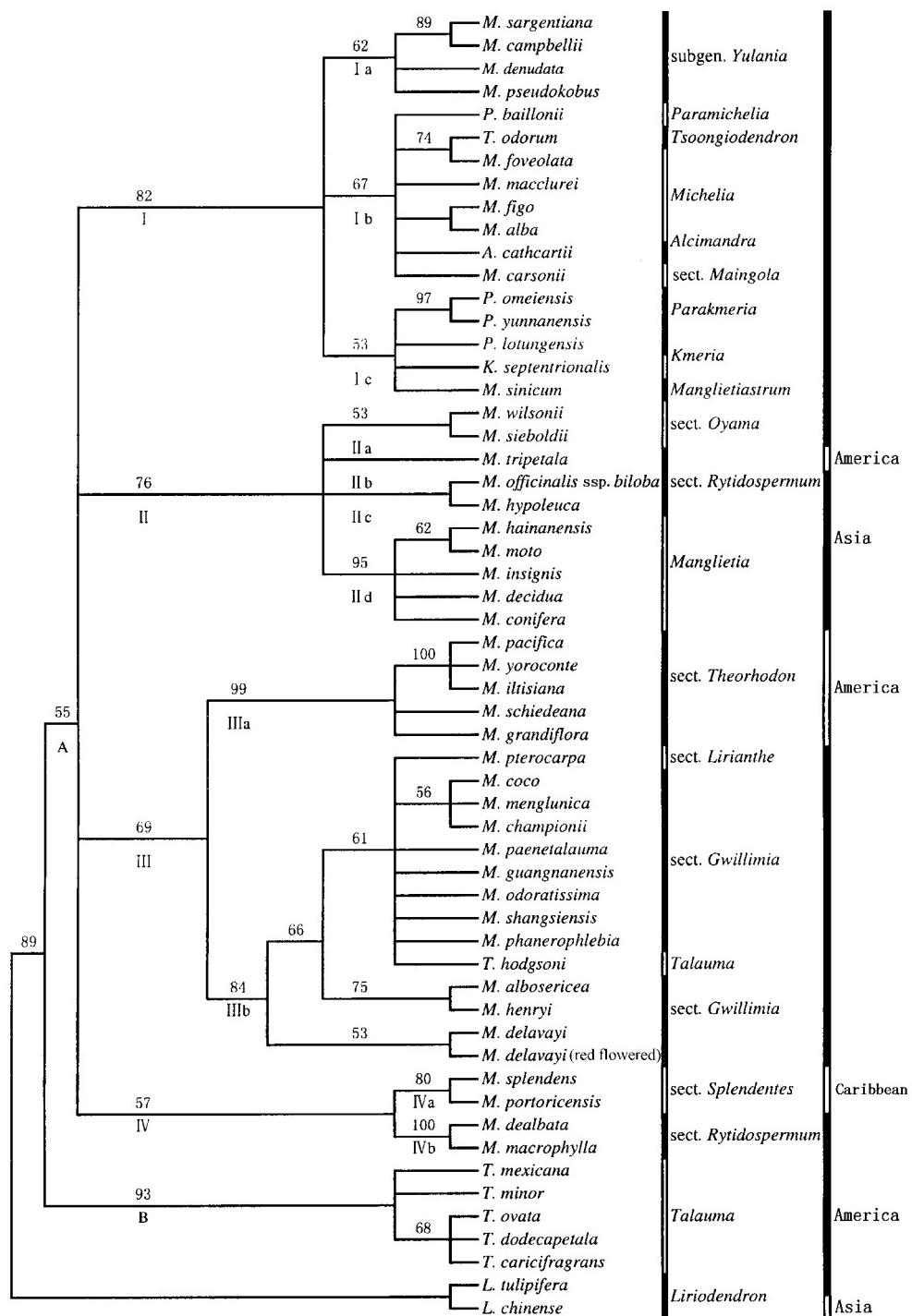


图1 基于matK序列分析得到的最大简约树

Fig. 1. The strict consensus tree of 176 most parsimonious trees generated from *matK* sequences. Numbers above the branches represent bootstrap values (only ones >50% are shown).

以鹅掌楸和北美鹅掌楸为外类群, 木兰亚科的分支得到89%的bootstrap值支持。木兰亚科形成2个分支, 其中盖裂木属分布于美洲的5个种成为一个单系类群(分支B), 得到93%的bootstrap值高度支持, 并与木兰亚科的其他种成为姊妹类群。

木兰亚科的其他种形成另一个分支, 得到55% bootstrap值支持(分支A)。分支A有4个亚分支(分支I、II、III、IV)。分支I主要由玉兰亚属、含笑属和拟单性木兰属组成, 合果木属、观光木属、长蕊木兰属、木兰亚属的*Maingola*组、单性木兰属和华盖木属嵌在其中, 此关系得到82%的bootstrap值支持, 显示这几个属存在较近的亲缘关系。该分支由Ia、Ib、Ic 3个次级分支组成: 玉兰亚属4个种为一个有62%的bootstrap值支持的分支(Ia); Ib由花腋生的含笑属的4个种、观光木*Tsoongiodendron odorum* Chun、合果木*Paramichelia baillonii* (Pierre) Hu以及花顶生的长蕊木兰*Alcimandra cathcartii* (Hook. f. & Thoms.) Dandy、木兰亚属*Maingola*组的*Magnolia carsonii* Dandy ex Noot.组成, 有67%的支持率; 拟单性木兰属的3个种和华盖木*Manglietiastrum sinicum* Law、单性木兰*Kmeria septentrionalis* Dandy组成分支Ic, 这个由花两性、杂性到单性的种类组成的分支得到53%的bootstrap值支持, 显示这3个属间有较近的亲缘关系。

分支II由木兰亚属的天女木兰组sect. *Oyama* Nakai、皱种组sect. *Rytidospermum* Spach的2个亚洲种和1个美洲种以及木莲属的5个种构成, 有76%的bootstrap值支持。其中木莲属形成一个被高度支持(95%)的单系类群(分支IId)。落叶木莲*Manglietia decidua* Q. Y. Zheng为落叶种类, 与木莲属的其他常绿种类不同, 据此曾建立华木莲属*Sinomanglietia* Z. X. Yu (俞志雄, 1994), 后因其主要性状仍与木莲属其他种类相同, 该种被并回木莲属(刘玉壶, 2004)。落叶木莲的*matK*序列与红花木莲*M. insignis* (Wall.) Bl.、球果木莲*M. conifera* Dandy只有3个碱基的差异。天女木兰组的2个种西康玉兰*Magnolia wilsonii* (Finet & Gagnep.) Rehd. 和天女木兰*M. sieboldii* K. Koch以53%的支持率聚在一起。皱种组中2个亚洲种日本厚朴*M. hypoleuca* Sieb. & Zucc. 和凹叶厚朴*M. officinalis* Rehd. & Wils. ssp. *biloba* (Rehd. & Wils.) Law关系较近, 与分布于美洲的三瓣木兰*M. tripetala* L. 关系较远。

分支III主要由木兰亚属的荷花玉兰组和常绿组两个亚分支组成, bootstrap值为69%。荷花玉兰组5个分布于北美的种以99%的置信度聚在一起。主要由常绿组形成的分支IIIb有84%的支持率, 木兰亚属翅喙组sect. *Lirianthe* (Spach) Dandy的*M. pterocarpa* Roxb. 和盖裂木属中唯一在中国有分布的盖裂木*Talauma hodgsoni* Hook. f. & Thoms. Fl. 嵌在常绿组中。

山玉兰*M. delavayi* Franch. 和红花山玉兰*M. delavayi* Franch. 只有1个共衍变异位点, 形成的分支支持率只有53%, 并与常绿组的其他种类互为姊妹类群。红花山玉兰作为山玉兰的颜色变异类型, 其*matK*序列相对原种在646位点(位点均从起始密码子处开始计算)处有1个T→C的转换。大叶玉兰*M. henryi* Dunn和绢毛木兰*M. albosericea* Chun & C. Tsoong形成一个置信度较高的分支(支持率75%), 并与其他常绿组种类形成又一姊妹类群。除山玉兰、大叶玉兰和绢毛木兰以外的常绿组其他8个种和*M. pterocarpa* Roxb.、盖裂木形成的分支有61%的支持率。这几个种均分布于中国东南、西南以及东南亚地区。大叶玉兰和盖裂木, 香港木兰*M. championii* Benth.、长叶木兰*M. paenetaluma* Dandy、馨香玉兰*M. odoratissima* Law & R. Z. Zhou、香木兰*M. guangnanica* Law & S. C. Yang、上思

木兰 *M. shangsiensis* Law, R. Z. Zhou & H. F. Chen 和 勐仑木兰 *M. menglunica* Q. W. Zeng & Law 在花和叶的形态上很相似, 但几个种在 *matK* 碱基序列上有差异: 长叶木兰在 330 位点处有一个 G→A 的转换, 馨香玉兰在 929 处有一个 A→C 的颠换, 显脉木兰 *M. phanerophlebia* B. L. Chen 在 1086 位点有一个 T→G 的颠换。翅喙组的 *M. pterocarpa* 在 717 和 926 位点处有 C→T 的转换和 G→C 的颠换。夜香木兰 *M. coco* (Lour.) DC.、香港木兰、勐仑木兰有 1 个共衍变异位点, 并以 56% 的支持率聚在一起, 这 3 个种的 *matK* 序列完全相同。形态上, 夜香木兰全体无毛, 花果下垂, 与后两者的明显不同。香木兰、上思木兰、盖裂木 3 个种的序列相同, 但 3 个种在外部形态上差别较大。而大叶玉兰和盖裂木在形态上非常相似, 没有果实两个种很难区别, 但两个种的 *matK* 序列相差了 14 个碱基, 亲缘关系也较远: 大叶玉兰和绢毛木兰聚在一起, 盖裂木和馨香玉兰、香木兰等 9 个种形成一个分支。

分支 IV 由木兰亚属的 *Splendentes* Dandy ex Vazquez 组(分支 IVa)和皱种组的美洲种 *M. macrophylla* Michaux.、*M. dealbata* Zucc. (分支 IVb)组成, 有 57% bootstrap 值支持。

在本研究中, 有几个种的 *matK* 序列完全相同: 盖裂木属的 *Talauma dodecapetala* (Lam.) Govaerts 和 *T. caricifragrans* (Lozano) Govaerts, 木莲属的红花木莲和球果木莲, 木兰属常绿组的夜香木兰、勐仑木兰和香港木兰, 香木兰、上思木兰和盖裂木, 荷花玉兰组的 *M. pacifica* Vazquez 和 *M. iltisiana* Vazquez, 拟单性木兰属的峨眉拟单性木兰 *Parakmeria omeiensis* Cheng 和 云南拟单性木兰 *P. yunnanensis* Hu。这些种在外部形态上, 有的较相似, 有的差异明显, 反映了木兰科植物的形态差异和基因变异有一定的不同步性。

3 讨论

测定的 1459 个 *matK* 序列的碱基变异率为 9.27%, 在木兰科系统研究中用过的叶绿体 DNA 序列中, *matK* 属变异率较高的。但相对其他被子植物, 木兰科 *matK* 序列的碱基变异位点要少得多, 表明木兰科植物在约 1 亿年的演化历程中, cpDNA 序列进化得很慢 (Azuma et al., 1999, 2000, 2001; Ueda et al., 2000; Kim et al., 2001; 王亚玲等, 2002)。

在系统发育树的主要分支上, *matK* 和 *ndhF* 序列、RFLP、RAPD 等分子标记的分析结果基本一致, 仅在个别类群的位置上有差异 (Qiu et al., 1995; Zeng et al., 2000; Kim et al., 2001): 在 *matK* 序列构建的系统树中, 木兰属的 *Splendentes* 组和皱种组的美洲种有较近的亲缘关系, 单性木兰属和拟单性木兰属、华盖木属的亲缘关系较近, 而在 *ndhF* 序列构建的系统树中, *Splendentes* 组和分布于美洲的盖裂木属植物亲缘关系较近, 单性木兰属和皱种组的 2 个美洲种亲缘关系较近。主要的结论有以下几点。

3.1 木兰属为一个多系类群

在以往主要根据形态性状建立的木兰科分类系统中, 木兰属具顶生花, 雌蕊群无柄, 心皮分离, 胚珠 2 枚, 包括木兰亚属和玉兰亚属 (Dandy, 1964, 1978; 刘玉壶, 1984)。*matK* 序列分析结果显示木兰属为一个多系起源的趋同演化类群: 玉兰亚属为一个单系群, 与木兰亚属的亲缘关系较远, 而与含笑属及华盖木属、拟单性木兰属的亲缘关系较近。形

态上, 木兰亚属花粉粒通常较大, 覆盖层光滑, 近似盖裂木属和木莲属, 而玉兰亚属的花粉粒小, 侧面观形态及表面雕纹与含笑属类似(Praglowski, 1974); 木兰亚属种子内种皮合点区多为孔状, 很少管状, 属分化程度较低的类群, 而玉兰亚属内种皮合点区为复合管的窝状, 附属物发达呈板状, 属分化程度较高的类群(张冰, 2001); 木兰亚属与玉兰亚属不仅因花期不遇而有生殖隔离, 人工杂交也不能结实或 F_1 代无活力, 而木兰科其他属内的种间通过人工杂交均能正常结实(龚洵等, 2001; 王亚玲等, 2003)。玉兰亚属与含笑亚属均为预生分枝(prolepsis), 木兰亚属中除天女木兰组外均为同生分枝(sylypesis)(Figlar, 2000)。RFLP标记、其他cpDNA序列分析也得出了同样的结果(Qiu et al., 1995; Azuma et al., 1999, 2000, 2001; Ueda et al., 2000; Kim et al., 2001)。傅大立(2001)提出: 玉兰亚属与木兰亚属为趋同演化的2个并系类群, 建议恢复玉兰属 *Yulania* Spach。玉兰亚属与木兰亚属的界限清楚, 应分开, 并保留木兰属。

3.2 木兰属和盖裂木属的关系

盖裂木属间断分布于东亚至东南亚和中美洲、南美洲的热带与亚热带地区。Nooteboom(2000, 2004)将盖裂木属作为木兰属盖裂木组sect. *Talauma* Baill. 处理。在 *matK* 序列分析中, 盖裂木属分布于美洲的5个种形成一个单系类群, 支持率为93%, 与木兰亚属的其他种类成为姊妹类群。而分布于亚洲的盖裂木属植物(*Blumiana* Blume组)则与产于东南亚的木兰亚属常绿组的种类成为单系。在形态上, 盖裂木属的成熟蓇葖果周裂, 木兰属为沿背缝线开裂。而木兰属的常绿组、翅喙组与盖裂木属 *Blumiana* 组形态上非常相似, 有些种类没有果实很难区别, 如盖裂木与大叶玉兰。分布于亚洲和美洲的两个盖裂木类群应是来自不同祖先而形态相似的不同类群, 是趋同演化的结果。*ndhF*序列分析也得出类似的结果(Kim et al., 2001)。

因此我们认为分布于亚洲的 *Blumiana* 组应该从盖裂木属中分出来, 并入木兰属; 分布于美洲的盖裂木属种类与木兰属的关系较远, 盖裂木属可以成立。

3.3 木兰属与木莲属的关系

Dandy(1964)最先以胚珠数不同为由将木莲属(具4枚以上胚珠)和木兰属(具2枚胚珠)分开。但木兰属的长叶木兰、山玉兰中也存在着多胚珠现象(2~7枚)(龚洵等, 1999); 两属在木材解剖、花粉形态(外壁雕纹和外壁结构)上很相似(张哲僧, 1974; Praglowski, 1974); 李捷(1997)用27个形态特征进行的分支分析结果支持木兰属和木莲属是一个单系类群的观点。但两属还存在很多明显的差异: 在木兰科中仅木莲属叶脉末端无石细胞, 而叶肉、表皮和皮层中有石细胞(Tucker, 1977); 该属的正常表皮细胞被表皮毛基所取代, 当毛脱落便在表皮角质层膜上留下一个孔, 此种原始结构在木兰科中也仅见于木莲属(Baranova, 1972); 木莲属种子内种皮合点区形态全为孔型, 且内种皮表面粗糙, 有瘤状突起, 种脊凹痕宽而深, 与木兰属的孔型种类明显不同(张冰, 2001); 木莲属与木兰属也不能像木兰科其他近缘属可以通过人工杂交产生有活力的 F_1 代(龚洵等, 2001; 王亚玲等, 2003)。

matK 序列分支结果也显示, 木莲属是一个置信度较高的单系类群(91%)。其分布主要在云南、广西、广东等省区, 在越南、缅甸等东南亚地区仅有少量的分布。相对集中的地理分布也反映到了基因水平上, 木莲属种间序列变异很小。*ndhF*序列分析也高度支持

木莲属为一单系类群(Kim et al., 2001)。

*matK*序列分析结果以76%的bootstrap值支持木莲属和木兰属的皱种组与天女木兰组亲缘关系较近。这两个组都为木兰亚属中的落叶类群，皱种组的叶集生于枝顶的习性也类似木莲属。综合考虑形态特征，木莲属与木兰属的属间界限清楚，木莲属的系统地位应被承认。

3.4 含笑属与木兰属的关系

根据花腋生和顶生的不同，刘玉壘(1984)将木兰亚科分为木兰族和含笑族。在*matK*分支图中，木兰族的玉兰亚属、拟单性木兰属、单性木兰属、华盖木属、长蕊木兰属与含笑族的3个属形成一个单系类群，83%的bootstrap值显示了这些顶花类群和腋花类群具较近的亲缘关系，顶生花和腋生花不足以作为分族依据。Nooteboom(1985)提出“含笑属的腋生单花是顶生于侧生短枝上，其实质也是顶生”的观点，并将含笑属作为合并后的木兰属的一个组sect. *Michelia* (L.) Baill. (Nooteboom, 2000)。我们认为，分族处理可以使人更清楚地理解木兰科内各属的进化关系，可以采用，但不应以花的着生位置作为分族的依据，且应将玉兰亚属、长蕊木兰属、拟单性木兰属、单性木兰属、华盖木属等归入含笑族中。花腋生是非常稳定的遗传性状，可以作为分属的依据，支持含笑属成立。

*matK*序列分析显示木兰亚属*Maingola*组的*Magnolia carsonii*与含笑属有很近的亲缘关系，该结果与木兰科的*ndhF*序列分析相一致。该组分布于热带亚洲，有着与含笑属相同的圆柱状果实。该组系统地位的确立还需更多的证据。

3.5 木兰属和几个单寡种属的关系

华盖木为刘玉壘先生1979年发表的一个种，并以其幼叶平展、导管分子的胞壁有螺纹加厚与木兰属和木莲属植物不同而建立华盖木属。Nooteboom(1985)将该种归入木兰属，后Chen和Nooteboom (1993)将其归入木莲属。

拟单性木兰属的花从两性到杂性，最先被处理为木兰属雌蕊群柄组sect. *Gynopodium* (Dandy, 1978; Nooteboom, 1985; Chen & Nooteboom, 1993)，后被处理为拟单性木兰属 (Hu & Cheng, 1951; 刘玉壘, 1984, 2004)。*matK*和*ndhF*序列分析(Kim et al., 2001)都显示华盖木属和拟单性木兰属亲缘关系较近。形态上二者均为常绿乔木，全株无毛，托叶与叶柄离生，幼叶在芽中不对折而抱住幼芽，雌蕊群具柄，木材导管具螺纹加厚。

单性木兰属是木兰科中唯一花单性、雌雄异株的属。在花粉形态上，单性木兰属与拟单性木兰属相似，花粉萌发实验也表明拟单性木兰属实为生理上的雌雄异花。拟单性木兰属为木兰科中两性花向单性花过渡的中间类群(徐凤霞, 1998, 2002)。Nooteboom(2000)最终将华盖木属、拟单性木兰属、单性木兰属归入木兰属。*matK*序列分析结果显示了这3个属有较近的亲缘关系，并得到53%的bootstrap值支持。这3个属都与木兰属玉兰亚属和含笑属的亲缘关系较近，而与木兰属木兰亚属和木莲属关系较远。本文结果不支持将这3个属归入木兰属或木莲属，而应归入含笑族。

3.6 木兰属中几个组之间的亲缘关系

荷花玉兰组与常绿组(包括翅喙组和盖裂木)形成一个有69% bootstrap值支持率的单系类群。RFLP的分析结果显示山玉兰和荷花玉兰有较近的亲缘关系(Qiu et al., 1995)。荷

花玉兰组主要分布在北美洲, 常绿组主要分布在东南亚和中国的东南和西南部, 两个组虽地理分布上完全隔离, 但组间可产生有活力的人工杂交F₁代(龚洵等, 2001; 王亚玲等, 2003)。

常绿组的12个种和翅喙组的*M. pterocarpa*以及盖裂木属的盖裂木都分布在亚洲的东南部, 在形态和基因水平上也都是相对一致的单系类群(有84%的bootstrap值支持)。*ndhF*序列分析也得到与此相同的结果, 故应将盖裂木从盖裂木属分出归入到木兰属常绿组。翅喙组的*M. pterocarpa*在形态上跟常绿组植物非常相似, 只是其蓇葖果的喙更长, 形成背面平且多少有些弯曲的革质附属物。序列分析显示该种与香港木兰等常绿组植物关系很近, 两个组应予合并。

Dandy原将*Splendentes*组的几个种置于荷花玉兰组中, 后Vázquez-Garcia(1994)将这几个种分出来, 建立了*Splendentes*组。形态上, 分布于加勒比海地区的*Splendentes*组植物雄蕊先端延伸成一个长刚毛状的附属物, 分布于北美地区的荷花玉兰组植物雄蕊顶端仅为一个短的尖头。*matK*的分支结果显示该组与荷花玉兰组的亲缘关系很远, 与皱种组分布于美洲的*M. macrophylla*和*M. dealbata*有较近的关系, 支持将*Splendentes*组从荷花玉兰组中分出来。

*matK*分支分析与其他序列分析结果相同: 间断分布的皱种组是个趋同演化的多系类群。分布于美洲的种类*M. macrophylla*和*M. dealbata*与*Splendentes*组关系较近, 分布于美洲的三瓣木兰与皱种组亚洲类群近缘。而且, 三瓣木兰与*M. macrophylla*人工杂交后不能结实或杂种无活力, 与分布于亚洲的厚朴*M. officinalis* Rehd. & Wils. 可产生有活力的杂种(Qiu et al., 1995)。

4 结论

*matK*序列分支分析和形态解剖学的研究成果表明, 木兰属是一个多系起源的趋同演化类群, 玉兰亚属从木兰属中分出来归入含笑族后, 可以很好地解决木兰属与其他属间的形态交叉问题。研究结果支持木兰属、玉兰属、木莲属、盖裂木属、含笑属成立。由于地理隔离所引起的趋同演化事件在木兰科中有很多, 而地理分布相对较集中的类群有着相对一致的基因变异, 如木莲属、木兰属常绿组、荷花玉兰组等。

有些形态上类似的种类, 在序列水平上却有较大差异(如大叶玉兰和盖裂木), 有些种类虽在形态上有明显的差异, *matK*序列却是相同的(如香港木兰和夜香木兰), 说明基因水平的进化与形态特征的演化不是完全平行的。

致谢 中国科学院华南植物研究所植物园曾庆文高级工程师为本实验提供部分测序材料, 在此深表谢意。

参 考 文 献

- Azuma H, Thien L B, Kawano S. 1999. Molecular phylogeny of *Magnolia* (Magnoliaceae) inferred from cpDNA sequences and evolutionary divergence of the floral scents. Journal of Plant Research 112: 291–306.
- Azuma H, Thien L B, Kawano S. 2000. Molecular phylogeny of *Magnolia* based on chloroplast DNA

- sequence data (*trnK* intron, *psbA-trnH* and *atpB-rbcL* intergenic spacer regions) and floral scent chemistry. In: Liu Y-H, Fan H-M eds. Proceedings of the International Symposium on the Family Magnoliaceae. Beijing: Science Press. 219–227.
- Azuma H, Garcia-Franco J G, Rico-Gray V, Thien L B. 2001. Molecular phylogeny of the Magnoliaceae: the biogeography of tropical and temperate disjunctions. American Journal of Botany 88: 2275–2285.
- Baranova M. 1972. Systematic anatomy of the epidermis in the Magnoliaceae and some related families. Taxon 21: 447–467.
- Chen B-L, Nooteboom H P. 1993. Notes on Magnoliaceae III: the Magnoliaceae of China. Annals of the Missouri Botanical Garden 80: 999–1104.
- Dandy J E. 1964. Magnoliaceae. In: Hutchinson J ed. The Genera of Flowering Plants, Dicotyledons. Oxford: Clarendon Press. 1: 50–57.
- Dandy J E. 1978. Revised survey of the genus *Magnolia* together with *Manglietia* and *Michelia*. In: Treseder N G ed. Magnolias. London: Faber and Faber. 29–37.
- Doyle J J, Doyle J L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemistry Bulletin 19: 11–15.
- Figlar R B. 2000. Proleptic branch initiation in *Michelia* and *Magnolia* subgenus *Yulania* provides basis for combinations in subfamily Magnolioideae. In: Liu Y-H, Fan H-M, Chen Z-Y, Wu Q-G, Zeng Q-W eds. Proceedings of the International Symposium on the Family Magnoliaceae. Beijing: Science Press. 14–25.
- Figlar R B, Nooteboom H P. 2004. Notes on Magnoliaceae IV. Blumea 49: 87–100.
- Fu D-L (傅大立). 2001. The study on *Yulania*. Journal of Wuhan Botanical Research (武汉植物学研究) 19: 191–198.
- Gong X (龚洵), Lu Y-X (鲁元学), Zhang Y-P (张彦萍), Wu Q-A (武全安), Yue Z-S (岳中枢). 1999. Discovery of 3–7 ovules in one carpel of *Magnolia delavayi*. Acta Botanica Yunnanica (云南植物研究) 21: 173–176.
- Gong X (龚洵), Pan Y-Z (潘跃芝), Yang Z-Y (杨志云). 2001. The cross-compatibility of Magnoliaceae. Acta Botanica Yunnanica (云南植物研究) 23: 339–344.
- Hall T A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series 41: 95–98.
- Hilu K W, Liang H-P. 1997. The *matK* gene: sequence variation and application in plant systematics. American Journal of Botany 84: 830–839.
- Hu H-H (胡先骕), Cheng W-C (郑万钧). 1951. *Parakmeria*, a new genus of Magnoliaceae of southwestern China. Acta Phytotaxonomica Sinica (植物分类学报) 1: 1–3.
- Jin H (金虹), Shi S-H (施苏华), Pan H-X (潘恒昶), Huang Y-L (黄椰林), Zhang H-D (张宏达). 1999. Phylogenetic relationships between *Michelia* (Magnoliaceae) and its related genera based on the *matK* gene sequence. Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni (中山大学学报自然科学版) 38: 93–97.
- Kalendar R. 2002. Oligos 9.6: Program for Design PCR Primers. Institute of Biotechnology University of Helsinki, Finland.
- Kim S, Park C-W, Kim Y-D, Suh Y. 2001. Phylogenetic relationships in family Magnoliaceae inferred from *ndhF* sequences. American Journal of Botany 88: 717–728.
- Law Y-W (刘玉壘). 1979. A new genus of Magnoliaceae of China. Acta Phytotaxonomica Sinica (植物分类学报) 17 (4): 72–74.
- Law Y-W (刘玉壘). 1984. A preliminary study on the taxonomy of the family Magnoliaceae. Acta Phytotaxonomica Sinica (植物分类学报) 22: 89–109.
- Law Y-W (刘玉壘). 2004. Magnolias of China (中国木兰). Beijing: Beijing Science & Technology Press.
- Li J (李捷). 1997. A cladistic analysis of Magnoliaceae. Acta Botanica Yunnanica (云南植物研究) 19: 342–356.
- Nooteboom H P. 1985. Notes on Magnoliaceae I. Blumea 31: 65–121.
- Nooteboom H P. 2000. Different looks at the classification of the Magnoliaceae. In: Liu Y-H, Fan H-M, Chen Z-Y, Wu Q-G, Zeng Q-W eds. Proceedings of the International Symposium on the Family Magnoliaceae. Beijing: Science Press. 26–37.
- Praglowski J. 1974. World Pollen and Spore Flora. Stockholm: Almqvist & Widells. 3: 1–44.
- Qiu Y-L, Chase M-W, Parks C-R. 1995. A chloroplast DNA phylogenetic study of the eastern Asia-eastern north America disjunct section *Rytidospermum* of *Magnolia* (Magnoliaceae). American Journal of Botany

- 82: 1582–1588.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson A R. 1977. DNA sequencing with chain-termination inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 74: 5463–5467.
- Shi S-H, Jin H, Huang Y-L, Pan H-C, Zhang Q, Chen T, Chang H-T. 2000. Preliminary study on the phylogeny of Magnoliaceae inferred from sequences of the *matK* gene of chloroplast DNA. In: Liu Y-H, Fan H-M, Chen Z-Y, Wu Q-G, Zeng Q-W eds. *Proceedings of the International Symposium on the Family Magnoliaceae*. Beijing: Science Press. 215–218.
- Swofford D L. 1998. PAUP*4.0: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (* and other methods). Beta version 4.0b. Sunderland: Sinauer Associates.
- Tucker S C. 1977. Foliar sclereids in the Magnoliaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society* 75: 325–356.
- Ueda K, Yamashita J, Tamura M N. 2000. Molecular phylogeny of the Magnoliaceae. In: Liu Y-H, Fan H-M eds. *Proceedings of the International Symposium on the Family Magnoliaceae*. Beijing: Science Press. 205–209.
- Vázquez-García J A. 1994. *Magnolia* (Magnoliaceae) in Mexico and central America: a synopsis. *Brittonia* 46: 1–23.
- Wang Y-L (王亚玲), Zhang S-Z (张寿洲), Cui T-C (崔铁成). 2002. The utility of *trnL* intron and *trnL-trnF* IGS in phylogenetic analysis of Magnoliaceae. *Acta Botanica Boreali-Occidentalis Sinica (西北植物学报)* 23: 247–252.
- Wang Y-L (王亚玲), Li Y (李勇), Zhang S-Z (张寿洲), Cui T-C (崔铁成). 2003. The crossing result of Magnoliaceae. *Journal of Wuhan Botanical Research (武汉植物学研究)* 21: 511–517.
- Xu F-X (徐凤霞). 1998. Study on pollen morphology of *Kmeria*. *Guizhou Botany (广西植物)* 18: 29–31.
- Xu F-X (徐凤霞). 2002. Study on pollen morphology of *Parakmeria lotungensis*. *Guizhou Botany (广西植物)* 22: 157–159.
- Yu Z-X (俞志雄). 1994. *Sinomanglietia*—a new genus of Magnoliaceae. *Journal of Jiangxi Agriculture University (江西农业大学学报)* 16: 5–9.
- Zeng Q-W (曾庆文), Wang T (王艇), Zhu J-M (朱建明), Su Y-J (苏应娟), Liu Y-H (刘玉壶). 2000. RAPD analysis on phylogeny of subtribe Micheliinae. In: Liu Y-H, Fan H-M, Chen Z-Y, Wu Q-G, Zeng Q-W eds. *Proceedings of the International Symposium on the Family Magnoliaceae*. Beijing: Science Press. 228–234.
- Zhang B (张冰). 2001. Systematic development of *Magnolia*. *Guizhou Botany (广西植物)* 21: 195–197.
- Zhang Z-S (张哲僧). 1974. Wood anatomy of *Tsoongiodendron odoratum* Chun. *Acta Botanica Sinica (植物学报)* 16: 156–157.